

PCT/JP99/05841

09 / 30 338 11.11.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/0841

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月26日

REC'D 06 JAN 2000

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第304550号

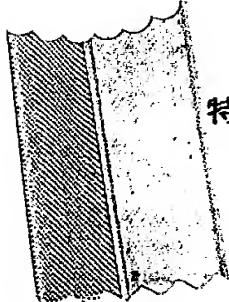
WIPO PCT

出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団
酒井 治美

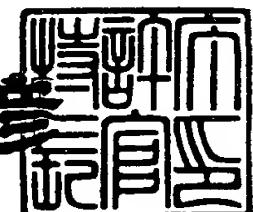
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月17日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆



出証番号 出証特平11-3087592

【書類名】 特許願
【整理番号】 NP98449-Y
【提出日】 平成10年10月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 39/395
G01N 33/53
【発明の名称】 ヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I Pに対する
モノクローナル抗体と、N A I Pの検定方法
【請求項の数】 18
【発明者】
【住所又は居所】 東京都目黒区上目黒5-31-1
【氏名】 池田 穩衛
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県厚木市元町1-20 シ
ヤトレ・ストンリバーII 207
【氏名】 酒井 治美
【特許出願人】
【識別番号】 396020800
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【特許出願人】
【識別番号】 597144912
【氏名又は名称】 酒井 治美
【代理人】
【識別番号】 100093230
【弁理士】
【氏名又は名称】 西澤 利夫
【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I Pに対するモノクローナル抗体と、N A I Pの検定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列を有するヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I Pを特異的に認識するモノクローナル抗体であって、配列番号1のアミノ酸番号256-586のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドを含む免疫原によって免疫した哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞株との融合細胞であるハイブリドーマ細胞群がそれぞれ產生する抗N A I Pモノクローナル抗体。

【請求項2】 エピトープ領域が、配列番号1のアミノ酸番号354-368の領域である請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体。

【請求項3】 エピトープ領域が、配列番号1のアミノ酸番号373-387の領域である請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体。

【請求項4】 マーカー標識した請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体とN A I Pを含む試料とを接触させて標識抗体とN A I Pを結合させ、この結合体におけるマーカーのシグナル強度を測定することを特徴とするN A I Pの検定方法。

【請求項5】 抗N A I Pモノクローナル抗体が、請求項2または3のモノクローナル抗体である請求項4のN A I P検定方法。

【請求項6】 マーカーが酵素、放射性同位体または蛍光色素である請求項4または5のN A I P検定方法。

【請求項7】 抗N A I P一次抗体とN A I Pを含む試料とを接触させて一次抗体とN A I Pを結合させ、この結合体に抗N A I P二次抗体を結合させ、この二次抗体に結合したマーカーのシグナル強度を測定する方法であって、

- (1) 一次抗体と二次抗体を請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体とする、
- (2) 一次抗体を請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体とし、二次抗体を抗N A I Pポリクローナル抗体とする、または
- (3) 一次抗体を抗N A I Pポリクローナル抗体とし、二次抗体を請求項1の抗

N A I P モノクローナル抗体とする、
ことを特徴とするN A I P の検定方法。

【請求項8】 一次抗体が固相化されている請求項7のN A I P 検定方法。

【請求項9】 抗N A I P モノクローナル抗体が、請求項2および／または3
のモノクローナル抗体である請求項7または8のN A I P 検定方法。

【請求項10】 マーカーが酵素、放射性同位体または蛍光色素である請求項
7、8または9のN A I P 検定方法。

【請求項11】 少なくとも以下の要素、
(a) 抗N A I P 一次抗体が固相化されたプレート、および
(b) マーカー標識された抗N A I P 二次抗体、
からなるキットであって、
(1) 一次抗体と二次抗体が請求項1の抗N A I P モノクローナル抗体である、
(2) 一次抗体が請求項1の抗N A I P モノクローナル抗体であり、二次抗体が
抗N A I P ポリクローナル抗体である、または
(3) 一次抗体が抗N A I P ポリクローナル抗体であり、二次抗体が請求項1の
抗N A I P モノクローナル抗体である、
ことを特徴とするN A I P 検定キット。

【請求項12】 抗N A I P モノクローナル抗体が、請求項2および／および
3のモノクローナル抗体である請求項11のN A I P 検定キット。

【請求項13】 マーカーが放射性同位体または蛍光色素である請求項11ま
たは12の検定キット。

【請求項14】 マーカーが酵素であり、さらに以下の要素、
(c) 酵素活性によって発色する基質
を有する請求項11または12の検定キット。

【請求項15】 少なくとも以下の要素、
(a) 抗N A I P 一次抗体が固相化されたプレート、
(b) 抗N A I P 二次抗体、および
(c) 二次抗体に結合するマーカー、
からなるキットであって、

- (1) 一次抗体と二次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体である、
 - (2) 一次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体であり、二次抗体が抗N A I Pポリクローナル抗体である、または
 - (3) 一次抗体が抗N A I Pポリクローナル抗体であり、二次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体である、
- ことを特徴とするN A I P検定キット。

【請求項16】 抗N A I Pモノクローナル抗体が、請求項2および／または3のモノクローナル抗体である請求項15のN A I P検定キット。

【請求項17】 マーカーが放射性同位体または蛍光色素である請求項15または16の検定キット。

【請求項18】 マーカーが酵素であり、さらに以下の要素、
(d) 酵素活性によって発色する基質
を有する請求項15または16の検定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願は、ヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I Pを特異的に認識するモノクローナル抗体と、このN A I Pの免疫検定法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】

アポトーシスは、プログラムされた細胞死の一種であり、周囲の細胞との接触の欠乏、細胞質の濃縮化、エンドヌクレアーゼの活性に関連したクロマチンの凝縮および核凝縮、核の断片化、膜被包性球状小体化、隣接するマクロファージもしくは上皮細胞などによる球状小体の貪食、またはエンドヌクレアーゼ活性によりDNAのヌクレオソーム単位が180～200塩基長のDNAに断片化するといった現象が観察され、このような現象が認められるアポブティック細胞の最終断片が隣接する細胞により貪食される機構として論じられている（例えば、Immuno
logy Today 7:115-119, 1986 ; Science 245:301-305, 1989）。

【0003】

このアポトーシスを制御する遺伝子としてしては、例えば、1985年に胞性B細胞腫から発見されたガン遺伝子のひとつである**ccl-2** 遺伝子が知られている。この**ccl-2** 遺伝子は、免疫系や神経性の細胞で高頻度に発現しており、この遺伝子の発現産物はこれら細胞のアポトーシスを抑制することによって、ヒトの免疫機能や神経系機能の恒常性を維持していると考えられている。また、この**ccl-2** 遺伝子は、胎児では特に広範囲には発現していることから、個体発生の際の形態形成にも重要な役割を果たしていると考えられてもいる。

【0004】

一方、この出願の発明者等は、家族性の遺伝病である脊髄性筋萎縮症候群 (Spinal Muscular Atrophy : SMA) の原因遺伝子として、ヒト染色体 5 q 1 3 . 1 領域より神経細胞アポトーシス抑制蛋白質 (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein : N A I P) 遺伝子を単離している (Roy et al., Cell 80: 167-178, 1995)。すなわち、このN A I P遺伝子の変異またはコピー数の減少が脊髄ニューロンのアポトーシスを生じさせ、これがSMA発症の原因となると想定されている。また、このN A I P遺伝子を種々の培養細胞に導入し、アポトーシスを誘起させる刺激を細胞に与えたところ、その細胞死が抑制されることが明らかにされ (Liston et al., Nature 379:349-353, 1996)、N A I Pが神経細胞だけではなく、体細胞全体のアポトーシス抑制因子であることが明らかにされている。

【0005】

そしてこの出願の発明者等は、N A I Pの全アミノ酸配列とN A I Pをコードするc D N Aを単離し、既に特許出願している（特願平9-280831号）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、N A I PはSMAをはじめとする各種アポトーシス性疾患に関与する蛋白質であり、それらの疾患の発症メカニズムの解明、発症の危険性の診断、発症の予防もしくは病態の改善、治療のための医療技術および薬剤の開発等のためには、N A I P発現量を正確に検定することが不可欠である。

【0007】

この出願の発明は以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、N A I P

の検定に不可欠な抗N A I Pモノクローナル抗体と、このモノクローナル抗体を用いたN A I P検定方法を提供することを課題としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明者等は、前記の課題を解決するために検討を重ねた結果、N A I Pの抗原領域が、配列番号1のアミノ酸番号256-586の領域であることを見出した。

この出願は、この知見に基づき、配列番号1のアミノ酸配列を有するヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I Pを特異的に認識するモノクローナル抗体であって、配列番号1のアミノ酸番号256-586のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドを含む免疫原によって免疫した哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞株との融合細胞であるハイブリドーマ細胞群がそれぞれ産生する抗N A I Pモノクローナル抗体を提供する。

【0009】

この出願はまた、モノクローナル抗体の具体例として、エピトープ領域が配列番号1のアミノ酸番号354-368の領域であるモノクローナル抗体h n m c 365と、同じくアミノ酸番号373-387の領域であるモノクローナル抗体h n m c 381を提供する。

またこの出願は、第1のN A I P検定方法として、マーカー標識した前記の抗N A I Pモノクローナル抗体とN A I Pを含む試料とを接触させて標識抗体とN A I Pを結合させ、この結合体におけるマーカーのシグナル強度を測定することを特徴とする方法を提供する。

【0010】

この第1の検定方法においては、抗N A I Pモノクローナル抗体が、前記のモノクローナル抗体h n m c 365またはh n m c 381であること、マーカーが酵素、放射性同位体または蛍光色素であることを好ましい態様としている。

さらにまたこの出願は、第2のN A I P検定方法として、抗N A I P一次抗体とN A I Pを含む試料とを接触させて一次抗体とN A I Pを結合させ、この結合体に抗N A I P二次抗体を結合させ、この二次抗体に結合したマーカーのシグナ

ル強度を測定する方法であって、

- (1) 一次抗体と二次抗体を請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体とする、
 - (2) 一次抗体を請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体とし、二次抗体を抗N A I Pポリクローナル抗体とする、または
 - (3) 一次抗体を抗N A I Pポリクローナル抗体とし、二次抗体を請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体とする、
- ことを特徴とする方法を提供する。

【0011】

この第2の検定方法においては、抗N A I P一次抗体が固相化されていること、抗N A I Pモノクローナル抗体が前記モノクローナル抗体h n m c 3 6 5および／またはh n m c 3 8 1であること、およびマーカーが酵素、放射性同位体または蛍光色素であることを好ましい態様としている。

この出願はまた、第1のN A I P検定キットとして、少なくとも以下の要素、

- (a) 抗N A I P一次抗体が固相化されたプレート、および
- (b) マーカー標識された抗N A I P二次抗体、

からなるキットであって、

- (1) 一次抗体と二次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体である、
- (2) 一次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体であり、二次抗体が抗N A I Pポリクローナル抗体である、または
- (3) 一次抗体が抗N A I Pポリクローナル抗体であり、二次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体である、

ことを特徴とするN A I P検定キットを提供する。

【0012】

この第1の検定キットにおいては、マーカーが放射性同位体または蛍光色素、もしくは酵素であることを好ましい態様としており、マーカーが酵素の場合には、さらに次の要素、

- (c) 酵素活性によって発色する基質

を有することを好ましい態様としている。

【0013】

この出願はまたさらに、第2のN A I P検定キットとして、少なくとも以下の要素、

- (a) 抗N A I P一次抗体が固相化されたプレート、
- (b) 抗N A I P二次抗体、および
- (c) 二次抗体に結合するマーカー、

からなるキットであって、

- (1) 一次抗体と二次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体である、
- (2) 一次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体であり、二次抗体が抗N A I Pポリクローナル抗体である、または
- (3) 一次抗体が抗N A I Pポリクローナル抗体であり、二次抗体が請求項1の抗N A I Pモノクローナル抗体である、

ことを特徴とするN A I P検定キットを提供する。

【0014】

この第2の検定キットにおいては、マーカーが放射性同位体または蛍光色素、もしくは酵素であることを好ましい態様としており、マーカーが酵素の場合には、さらに次の要素、

- (d) 酵素活性によって発色する基質

を有することを好ましい態様としている。

【0015】

なお、これらの検定キットにおいては、抗N A I Pモノクローナル抗体が、前記モノクローナル抗体h n m c 3 6 5および／またはh n m c 3 8 1であることを好ましい態様としている。

以下、この発明の実施形態について詳しく説明する。

【0016】

【発明の実施の形態】

この発明の抗N A I Pモノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作成法（「単クローニング抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年； "Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い、例えば以下の様な手順で作製することができる。

1：ハイブリドーマ細胞群の作製

配列番号1のアミノ酸番号256-586またはその一部配列からなるポリペプチドを含む免疫原を用いて哺乳動物を免疫し、必要に応じて適宜に追加免疫して動物を充分に感化する。次いでこの動物から抗体産生細胞（リンパ細胞または脾臓細胞）を摘出し、これとミエローマ（骨髄種）細胞株との融合細胞を得る。そして、これらの融合細胞株から、目的とするモノクローナル抗体をそれぞれに产生する複数の細胞を選択し、培養することによって、ハイブリドーマ細胞群を得ることができる。以下、各工程を詳しく説明する。

a) 免疫原の調製

配列番号1のアミノ酸番号256-586のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、配列番号2のヌクレオチド配列を有するN A I P c D N Aのヌクレオチド番号1056-2049を含むD N A断片を制限酵素切断等により切り出し、このD N A断片を適當な宿主-ベクター系で発現させることによって調製することができる。

【0017】

あるいは、配列番号1のアミノ酸番号256-586の領域の一部連續配列（10-20アミノ酸）からなるポリペプチドを調製してもよい。この場合、配列の異なるポリペプチドを用いることによって、エピトープの異なるモノクローナル抗体をそれぞれに产生するハイブリドーマ細胞群が得られる。

これらのポリペプチドは、他の蛋白質（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ：G S T）との融合蛋白質の形で使用することもできる。このような融合蛋白質の使用は、宿主-ベクター系の発現産物からの目的蛋白質の単離、および後記するハイブリドーマ細胞のスクリーニング工程を容易かつ確実とする点において特に好ましい。

【0018】

なお、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸番号256-586における1以上のアミノ酸残基が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するもの、あるいはそのような欠失、置換または付加を有する一部連續配列からなるものであってもよい。

b) 動物の免疫

被免疫動物としては、公知のハイブリドーマ作製法に用いられる哺乳動物を使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等である。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点からは、マウスまたはラットを被免疫動物とするのが好ましい。また、実際に使用するマウスおよびラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、RIII、SJL、SWR、WB、129 等が、またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer 等を用いることができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは BALB/c 系統が、ラットでは Low 系統が被免疫動物として特に好ましい。なお、これらマウスまたはラットの免疫時の週齢は 5~12 週齢が好ましい。

【0019】

動物の免疫は、免疫原であるポリペプチド溶液を動物の皮内または腹腔内に投与することによって行うことができる。抗原の投与スケジュールは被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数 2~6 回、投与間隔 1~2 週間が好ましい。また、抗原の投与量は動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、 $10\text{--}100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 程度とする。

c) 細胞融合

上記の投与スケジュールの最終免疫日から 1~5 日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞またはリンパ細胞を無菌的に取り出す。これらの脾臓細胞またはリンパ細胞からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法に従って行うことができる。

【0020】

次いで、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する。このミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立している H G P R T (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transfer

ase)欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来の X63-Ag8(X63), NS1-Ag4/1(NS-1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), F0, S149/5XX0,BU.1等、ラット由来の 210.RSY3. Ag.1.2.3(Y3)等、ヒト由来の U266AR(SKO-007), GM1500・GTG-A12(GM1500), UC7 29-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2), 8226AR/NIP4-1(NP41)等である。

【0021】

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

【0022】

融合細胞と非融合細胞の選択は、例えば、公知のHAT（ヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン）選択法により行うのが好ましい。この方法は、アミノブテリン存在下で生存し得ないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いて融合細胞を得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞および融合細胞をHAT培地で培養することにより、アミノブテリンに対する耐性を持ち合わせた融合細胞のみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

d) ハイブリドーマのスクリーニング

目的とするモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングは、公知の酵素免疫検定法（EIA : Enzyme Immunoassay）、放射線免疫測定法（RIA : Radio Immunoassay）、蛍光抗体法等により行うことができる。また、融合蛋白質を免疫原とした場合には、融合パートナーである蛋白質について上記の各スクリーニング方法を併せて実施することによって、より確実にハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることができる。

【0023】

このようなスクリーニングによって、エピトープ領域の異なるモノクローナル抗体をそれぞれに產生するハイブリドーマ細胞群が得られる。従って、この発明のモノクローナル抗体は、前記の方法によって作製されたハイブリドーマ細胞群

の各々が産生する複数のモノクローナル抗体を全て含むものである。

なお、スクリーニング後のハイブリドーマ細胞は、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釀法等の公知の方法によりクローニングし、抗体産生に用いる。

【0024】

以上の通りの方法によって得たハイブリドーマ細胞は、液体窒素中または-80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

2：モノクローナル抗体の取得および精製

上記1で作成したハイブリドーマ細胞を公知の方法で培養することによって、N A I P を特異的に認識するモノクローナル抗体を得ることができる。

【0025】

培養は、例えば、前記のクローニング法で使用した同じ組成の培地中で培養してもよく、あるいはモノクローナル抗体を大量に産生するためには、マウス腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取してもよい。

このようにして得たモノクローナル抗体は、例えば硫安塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティーコロマトグラフィー法等により精製することができる。

【0026】

次のこの発明のN A I P 検定方法について説明する。

第1の検定方法は、マーカー標識した抗N A I P モノクローナル抗体 (M-mA b) 溶液とN A I P を含む試料とを接触させて標識モノクローナル抗体とN A I P を結合させ、この結合体 (M-mA b : N A I P) を分離する。分離手段としては、クロマト法、塩析法、アルコール沈殿法、酵素法、固相法等の公知の方法を採用することができる。そして、マーカーとして酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較からN A I P 量が算出される。マーカーとして放射性同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。ま

た、マーカーとして蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

【0027】

第2の検定方法は、N A I Pに対するエピトープ領域の異なる2種類の抗体（一次抗体および二次抗体）を用いる。具体的には、先ず、一次抗体（A b I）とN A I Pを含む試料とを接触させて両者を結合させ、この結合体（A b I : N A I P）にマーカー標識した二次抗体（M-A b II）を結合させ、この三者の結合体（A b I : N A I P : M-A b II）におけるマーカーのシグナル強度を測定する。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず結合体（A b I : N A I P）に結合させ、この二次抗体にマーカーを結合させるようにしてもよい。このような二次抗体へのマーカー標識分子の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、マーカーをアビジン化しておくことによって行うことができる。あるいは、二次抗体の一部領域（例えば、F c 領域）を認識する抗体（三次抗体）をマーカー標識し、この三次抗体を二次抗体（II）に結合させるようにしてもよい。なお、一次抗体と二次抗体は、両方ともこの発明の抗N A I Pモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方を抗N A I Pポリクローナル抗体（例えば、前記ポリペプチドで免疫した動物の抗血清）とすることもできる。

【0028】

この第2の方法は、液相系で行うこともでき、または固相系で行うこともできるが、極微量定量と操作の簡便化のためには、固相系で行うことが好ましい。すなわちこの固相系の方法は、一次抗体を樹脂プレート等に固相化し、この固相化抗体にN A I Pを結合させ、非結合N A I Pを洗浄した後、プレート上に残った結合N A I Pに二次抗体を結合させ、この二次抗体のシグナル強度を測定する方法である。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「E L I S A (enzyme linked immunospecific assay)」として広く用いられている方法である。

【0029】

これらの方法においてマーカーとして用いる酵素は、turn over numberが大で

あること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、通常のEIAに用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフェオヌファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リシン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素とモノクローナル抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3'5,5'-テトラメチルベンジンを、また酵素としてアルカリフェオヌファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。

【0030】

マーカーとして用いる放射性同位体としては、 ^{125}I や ^3H 等の通常のRIAで用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート(FITC)やテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。

【0031】

この発明の検定キットは、上記第2の検定方法を固相系で行うサンドイッチ法のためのキットである。このようなキットは、被検成分の種類に応じて各種のものが市販されており、この発明の検定キットも、抗体として前記抗NAPモノクローナル抗体および／または抗NAPポリクローナル抗体を用いることを除き、公知公用のキットに用いられている各要素によって構成することができる。また、前記構成要素からなるこの発明の検定キットには、非結合NAPおよび／または非結合二次抗体を洗浄するための洗浄液を備えるようにしてもよい。

【0032】

【実施例】

以下、実施例を示してこの発明を詳細かつ具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1：モノクローナル抗体の作成

(1) 免疫原の調製

配列番号1にスクレオチド配列を示したN A I P c D N A の1056-2049番目領域（N A I P 256-586 領域）を増幅し、このD N A 断片をp G E X - 3 X (Pharmacia社製) の制限酵素E co R I 部位に挿入した。塩基配列を確認した後、この組換えベクター p G E X - 3 X (N A I P . 256-586) で宿主大腸菌B L 21 (DE 3) p L y s S を形質転換し、L B 培地中で30°Cで5時間培養し、IPTGを加え、さらに20°Cで3時間培養した。菌体を遠心により分離し、溶解溶液 (P B S、Triton X-100) に溶かし、一度-80°Cで凍結させ融解させた後、超音波破碎を行った。1000 × gで30分遠心し、上清をグルタチオンセファロース4 B カラムに通液し、G S T - N A I P (256-586) 融合蛋白質を得た。

(2) 動物の免疫

前記(1)で得た融合蛋白質50 μg / μl をBalb/cマウスの腹腔内に投与して初回免疫とした。初回免疫から2週間後の2回目の免疫を行い、その後は1週間間隔で6回まで免疫した。なお、融合蛋白質は、初回免疫では等量のFreund完全アジュバンドと混合して投与し、2回目から5回目までFreund不完全アジュバンドと混合して投与した。最終免疫は融合蛋白質溶液のみを投与した。

(3) 細胞融合

最終免疫日の3日後に脾臓細胞を無菌的に摘出し、この脾臓細胞とマウスのミエローマ細胞株S P 2 / 0 - Ag14 とを混合し、ポリエチレングリコール#4000を用いて融合処理した。得られた細胞を96穴プレートにまき、H A T 培地により融合細胞を選択した。

(4) スクリーニング

免疫原として使用したN A I P ポリペプチドを固相化したE L I S A プレートと、G S T を固相化したE L I S A プレートを作製し、G S T プレートには反応せず、N A I P プレートにのみ反応するクローンを選択し、スクリーニングした。次いで、各ハイブリドーマの培養上清のうち、N A I P ポリペプチドに反応するウェルを陽性として、陽性ウェルより限界希釀法を用いてハイブリドーマのクローニングを行い、单一クローンとなったハイブリドーマの培地に対して再度ス

クリーニングを行い、複数のハイブリドーマ細胞を得た。

(5) モノクローナル抗体の作成

得られた2種類のハイブリドーマ細胞をBalb/c系マウスの腹腔内にそれぞれ投与し、1週間後にモノクローナル抗体を含む腹水を採取した。この腹水から、プロテインGを用いたアファニティーカラムにより2種類のモノクローナル抗体hnmc365およびhnmc381を精製した。

【0033】

hnmc365はサブクラスIgG1で、そのエピトープ領域は配列番号1のアミノ酸番号354-368の領域であり、hnmc381はサブクラスIgG2bで、エピトープ領域は配列番号1のアミノ酸番号373-387の領域であることを確認した。

実施例2：ポリクローナル抗体の作成

実施例1(1)と同様に調製したGST-NAIP(256-586)融合蛋白質を免疫原として、定法によりウサギ(Japanese White Rabbit)を免疫し、抗血清を単離し、上記融合蛋白質を結合したセファロース4Bカラムによってポリクローナル抗体を精製した。

実施例3：ELISAキットの作成

(1) 一次抗体固相化プレート

150mmol/lの塩化ナトリウムおよび1g/Lのアジ化ナトリウムを含む10mmol/lのリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に、実施例1で作成したの抗NAIPモノクローナル抗体hnmc365溶液(20μg/ml)を溶解し、この溶液をELISA用96穴プレートの各穴に50μlずつ分注した。4℃で16時間保存後、150mmol/lの塩化ナトリウムを含む10mmol/lのリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)で洗浄し、抗NAIPモノクローナル抗体固相化プレートを作成した。

(2) ビオチン化二次抗体

実施例2で作成した抗NAIPポリクローナル抗体10mgに対し、N,N-ジメチルホルムアミドに溶解したビオチンアミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを0.01mmol添加した。25℃で3時間保温後、50mmol/lのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中で16時間透析を行い、ビオチン化抗NAIPポリクロ

ーナル抗体を作成した。

(3) 二次抗体結合マーカー

西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を、150mmol/l の塩化ナトリウムおよび1g/l のカゼインを含む10mmol/lのリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)で0.5 μg/mlの濃度に希釈し、マーカー溶液とした。

実施例4：N A I P 検定

(1) 操作方法

精製N A I P を様々な濃度で含有する試料溶液を、150mmol/l の塩化ナトリウムを含む10mmol/lリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)で希釈し、実施例3(1)の一次抗体固相化プレートの各穴に50 μl づつ分注した。37°Cで1時間保温後、150mmol/l 塩化ナトリウムを含む10mmol/lリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)で洗浄した。

【0034】

次に、実施例3(2)のビオチン化抗N A I P ポリクローナル抗体を、150mmol/l 塩化ナトリウムおよび1g/l カゼインを含む10mmol/lリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)で0.5 μg/ml濃度に希釈し、前記プレートの各穴に100 μl づつ分注した。37°Cで1時間保温後、150mmol/l 塩化ナトリウムを含む10mmol/lリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)で洗浄した。

【0035】

最後に、実施例3(3)の西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を前記プレートの各穴に100 μl づつ分注し、37°Cで1時間保温後、150mmol/l 塩化ナトリウムを含む10mmol/lリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)で洗浄した。

(2) 発色反応・吸光度測定

3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを50mmol/l濃度となるようにN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、この溶液を100mmol/l 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)で1/100に希釈し、ろ紙でろ過した。この溶液10mlに10g/l の過酸化水素水を0.1ml 添加し、発色液とした。この発色液を前記プレートの各穴に50 μl づつ分注し、30°Cで30分間保温した後、2mol/l 硫酸を各穴に50 μl づつ分注し、

反応を停止させた後、450nm の吸光度を測定した。

(3) 結果

図1は、試料溶液中の精製N A I P濃度と前記方法により測定した吸光度との関係を示したグラフ図である。試料中のN A I P濃度は測定限界4ng/ml から20ng/ml の範囲で検定可能であった。

【0036】

この結果から、例えば図1のような測定結果を標準線とすることによって、N A I P濃度未知の試料についても、その吸光度からN A I P濃度を正確に検定することが可能であることが確認された。

【0037】

【発明の効果】

以上詳しく述べたとおり、この出願によって、生体試料中のヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I Pを簡便かつ高精度で定量化することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

試料溶液中の精製N A I P濃度と前記方法により測定した吸光度との関係を示したグラフ図である。

【配列表】

Sequence Listing

<110> Applicant name: Japan Science and Technology Corporation,
and Hatumi SAKAI

<120> Title of Invention: ヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I P
に対するモノクローナル抗体と、
N A I P検定方法

<130> File reference: NP98449

<160> Nuber of SEQ ID Nos: 2

<210> SEQ ID NO (配列番号) : 1

<211> Length: 1403

<212> Type: PRT

<213> Organism: homosapiens

<400> Sequence

Met Ala Thr Gln Gln Lys Ala Ser Asp Glu Arg Ile Ser Gln Phe Asp			
1	5	10	15
His Asn Leu Leu Pro Glu Leu Ser Ala Leu Leu Gly Leu Asp Ala Val			
20	25	30	
Gln Leu Ala Lys Glu Leu Glu Glu Glu Gln Lys Glu Arg Ala Lys			
35	40	45	
Met Gln Lys Gly Tyr Asn Ser Gln Met Arg Ser Glu Ala Lys Arg Leu			
50	55	60	
Lys Thr Phe Val Thr Tyr Glu Pro Tyr Ser Ser Trp Ile Pro Gln Glu			
65	70	75	80
Met Ala Ala Ala Gly Phe Tyr Phe Thr Gly Val Lys Ser Gly Ile Gln			
85	90	95	
Cys Phe Cys Cys Ser Leu Ile Leu Phe Gly Ala Gly Leu Thr Arg Leu			
100	105	110	
Pro Ile Glu Asp His Lys Arg Phe His Pro Asp Cys Gly Phe Leu Leu			
115	120	125	
Asn Lys Asp Val Gly Asn Ile Ala Lys Tyr Asp Ile Arg Val Lys Asn			
130	135	140	
Leu Lys Ser Arg Leu Arg Gly Gly Lys Met Arg Tyr Gln Glu Glu			
145	150	155	160
Ala Arg Leu Ala Ser Phe Arg Asn Trp Pro Phe Tyr Val Gln Gly Ile			
165	170	175	
Ser Pro Cys Val Leu Ser Glu Ala Gly Phe Val Phe Thr Gly Lys Gln			
180	185	190	
Asp Thr Val Gln Cys Phe Ser Cys Gly Gly Cys Leu Gly Asn Trp Glu			
195	200	205	
Glu Gly Asp Asp Pro Trp Lys Glu His Ala Lys Trp Phe Pro Lys Cys			

210	215	220
Glu Phe Leu Arg Ser Lys Lys Ser Ser Glu Glu Ile Thr Gln Tyr Ile		
225	230	235
Gln Ser Tyr Lys Gly Phe Val Asp Ile Thr Gly Glu His Phe Val Asn		
245	250	255
Ser Trp Val Gln Arg Glu Leu Pro Met Ala Ser Ala Tyr Cys Asn Asp		
260	265	270
Ser Ile Phe Ala Tyr Glu Glu Leu Arg Leu Asp Ser Phe Lys Asp Trp		
275	280	285
Pro Arg Glu Ser Ala Val Gly Val Ala Ala Leu Ala Lys Ala Gly Leu		
290	295	300
Phe Tyr Thr Gly Ile Lys Asp Ile Val Gln Cys Phe Ser Cys Gly Gly		
305	310	315
Cys Leu Glu Lys Trp Gln Glu Gly Asp Asp Pro Leu Asp Asp His Thr		
325	330	335
Arg Cys Phe Pro Asn Cys Pro Phe Leu Gln Asn Met Lys Ser Ser Ala		
340	345	350
Glu Val Thr Pro Asp Leu Gln Ser Arg Gly Glu Leu Cys Glu Leu Leu		
355	360	365
Glu Thr Thr Ser Glu Ser Asn Leu Glu Asp Ser Ile Ala Val Gly Pro		
370	375	380
Ile Val Pro Glu Met Ala Gln Gly Glu Ala Gln Trp Phe Gln Glu Ala		
385	390	395
Lys Asn Leu Asn Glu Gln Leu Arg Ala Ala Tyr Thr Ser Ala Ser Phe		
405	410	415
Arg His Met Ser Leu Leu Asp Ile Ser Ser Asp Leu Ala Thr Asp His		
420	425	430
Leu Leu Gly Cys Asp Leu Ser Ile Ala Ser Lys His Ile Ser Lys Pro		
435	440	445

Val Gln Glu Pro Leu Val Leu Pro Glu Val Phe Gly Asn Leu Asn Ser
 450 455 460
 Val Met Cys Val Glu Gly Glu Ala Gly Ser Gly Lys Thr Val Leu Leu
 465 470 475 480
 Lys Lys Ile Ala Phe Leu Trp Ala Ser Gly Cys Cys Pro Leu Leu Asn
 485 490 495
 Arg Phe Gln Leu Val Phe Tyr Leu Ser Leu Ser Ser Thr Arg Pro Asp
 500 505 510
 Glu Gly Leu Ala Ser Ile Ile Cys Asp Gln Leu Leu Glu Lys Glu Gly
 515 520 525
 Ser Val Thr Glu Met Cys Met Arg Asn Ile Ile Gln Gln Leu Lys Asn
 530 535 540
 Gln Val Leu Phe Leu Leu Asp Asp Tyr Lys Glu Ile Cys Ser Ile Pro
 545 550 555 560
 Gln Val Ile Gly Lys Leu Ile Gln Lys Asn His Leu Ser Arg Thr Cys
 565 570 575
 Leu Leu Ile Ala Val Arg Thr Asn Arg Ala Arg Asp Ile Arg Arg Tyr
 580 585 590
 Leu Glu Thr Ile Leu Glu Ile Lys Ala Phe Pro Phe Tyr Asn Thr Val
 595 600 605
 Cys Ile Leu Arg Lys Leu Phe Ser His Asn Met Thr Arg Leu Arg Lys
 610 615 620
 Phe Met Val Tyr Phe Gly Lys Asn Gln Ser Leu Gln Lys Ile Gln Lys
 625 630 635 640
 Thr Pro Leu Phe Val Ala Ala Ile Cys Ala His Trp Phe Gln Tyr Pro
 645 650 655
 Phe Asp Pro Ser Phe Asp Asp Val Ala Val Phe Lys Ser Tyr Met Glu
 660 665 670
 Arg Leu Ser Leu Arg Asn Lys Ala Thr Ala Glu Ile Leu Lys Ala Thr

675	680	685
Val Ser Ser Cys Gly Glu Leu Ala Leu Lys Gly Phe Phe Ser Cys Cys		
690	695	700
Phe Glu Phe Asn Asp Asp Asp Leu Ala Glu Ala Gly Val Asp Glu Asp		
705	710	715
Glu Asp Leu Thr Met Cys Leu Met Ser Lys Phe Thr Ala Gln Arg Leu		
725	730	735
Arg Pro Phe Tyr Arg Phe Leu Ser Pro Ala Phe Gln Glu Phe Leu Ala		
740	745	750
Gly Met Arg Leu Ile Glu Leu Leu Asp Ser Asp Arg Gln Glu His Gln		
755	760	765
Asp Leu Gly Leu Tyr His Leu Lys Gln Ile Asn Ser Pro Met Met Thr		
770	775	780
Val Ser Ala Tyr Asn Asn Phe Leu Asn Tyr Val Ser Ser Leu Pro Ser		
785	790	795
Thr Lys Ala Gly Pro Lys Ile Val Ser His Leu Leu His Leu Val Asp		
805	810	815
Asn Lys Glu Ser Leu Glu Asn Ile Ser Glu Asn Asp Asp Tyr Leu Lys		
820	825	830
His Gln Pro Glu Ile Ser Leu Gln Met Gln Leu Leu Arg Gly Leu Trp		
835	840	845
Gln Ile Cys Pro Gln Ala Tyr Phe Ser Met Val Ser Glu His Leu Leu		
850	855	860
Val Leu Ala Leu Lys Thr Ala Tyr Gln Ser Asn Thr Val Ala Ala Cys		
865	870	875
Ser Pro Phe Val Leu Gln Phe Leu Gln Gly Arg Thr Leu Thr Leu Gly		
885	890	895
Ala Leu Asn Leu Gln Tyr Phe Phe Asp His Pro Glu Ser Leu Ser Leu		
900	905	910

Leu Arg Ser Ile His Phe Pro Ile Arg Gly Asn Lys Thr Ser Pro Arg
 915 920 925
 Ala His Phe Ser Val Leu Glu Thr Cys Phe Asp Lys Ser Gln Val Pro
 930 935 940
 Thr Ile Asp Gln Asp Tyr Ala Ser Ala Phe Glu Pro Met Asn Glu Trp
 945 950 955 960
 Glu Arg Asn Leu Ala Glu Lys Glu Asp Asn Val Lys Ser Tyr Met Asp
 965 970 975
 Met Gln Arg Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ser Thr Gly Tyr Trp Lys Leu
 980 985 990
 Ser Pro Lys Gln Tyr Lys Ile Pro Cys Leu Glu Val Asp Val Asn Asp
 995 1000 1005
 Ile Asp Val Val Gly Gln Asp Met Leu Glu Ile Leu Met Thr Val Phe
 1010 1015 1020
 Ser Ala Ser Gln Arg Ile Glu Leu His Leu Asn His Ser Arg Gly Phe
 1025 1030 1035 1040
 Ile Glu Ser Ile Arg Pro Ala Leu Glu Leu Ser Lys Ala Ser Val Thr
 1045 1050 1055
 Lys Cys Ser Ile Ser Lys Leu Glu Leu Ser Ala Ala Glu Gln Glu Leu
 1060 1065 1070
 Leu Leu Thr Leu Pro Ser Leu Glu Ser Leu Glu Val Ser Gly Thr Ile
 1075 1080 1085
 Gln Ser Gln Asp Gln Ile Phe Pro Asn Leu Asp Lys Phe Leu Cys Leu
 1090 1095 1100
 Lys Glu Leu Ser Val Asp Leu Glu Gly Asn Ile Asn Val Phe Ser Val
 1105 1110 1115 1120
 Ile Pro Glu Glu Phe Pro Asn Phe His His Met Glu Lys Leu Leu Ile
 1125 1130 1135
 Gln Ile Ser Ala Glu Tyr Asp Pro Ser Lys Leu Val Lys Leu Ile Gln

1140	1145	1150
Asn Ser Pro Asn Leu His Val Phe His Leu Lys Cys Asn Phe Phe Ser		
1155	1160	1165
Asp Phe Gly Ser Leu Met Thr Met Leu Val Ser Cys Lys Lys Leu Thr		
1170	1175	1180
Glu Ile Lys Phe Ser Asp Ser Phe Phe Gln Ala Val Pro Phe Val Ala		
1185	1190	1195
Ser Leu Pro Asn Phe Ile Ser Leu Lys Ile Leu Asn Leu Glu Gly Gln		
1205	1210	1215
Gln Phe Pro Asp Glu Glu Thr Ser Glu Lys Phe Ala Tyr Ile Leu Gly		
1220	1225	1230
Ser Leu Ser Asn Leu Glu Glu Leu Ile Leu Pro Thr Gly Asp Gly Ile		
1235	1240	1245
Tyr Arg Val Ala Lys Leu Ile Ile Gln Gln Cys Gln Gln Leu His Cys		
1250	1255	1260
Leu Arg Val Leu Ser Phe Phe Lys Thr Leu Asn Asp Asp Ser Val Val		
1265	1270	1275
1280		
Glu Ile Ala Lys Val Ala Ile Ser Gly Gly Phe Gln Lys Leu Glu Asn		
1285	1290	1295
Leu Lys Leu Ser Ile Asn His Lys Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Arg Asn		
1300	1305	1310
Phe Phe Gln Ala Leu Asp Asn Met Pro Asn Leu Gln Glu Leu Asp Ile		
1315	1320	1325
Ser Arg His Phe Thr Glu Cys Ile Lys Ala Gln Ala Thr Thr Val Lys		
1330	1335	1340
Ser Leu Ser Gln Cys Val Leu Arg Leu Pro Arg Leu Ile Arg Leu Asn		
1345	1350	1355
Met Leu Ser Trp Leu Leu Asp Ala Asp Asp Ile Ala Leu Leu Asn Val		
1365	1370	1375

Met Lys Glu Arg His Pro Gln Ser Lys Tyr Leu Thr Ile Leu Gln Lys

1380

1385

1390

Trp Ile Leu Pro Phe Ser Pro Ile Ile Gln Lys

1395

1400

1403

<210> SEQ ID NO (配列番号) : 2

<211> Length: 5984

<212> Type: DNA

<213> Organism: homosapiens

<220> Feature

<221> Name/key: CDC

<222> Location: 292..4500

<400> Sequence

ACAAAAGGTC CTGTGCTCAC	CTGGGACCCCT TCTGGACGTT	GCCCTGTGTT CCTCTTCGCC	60
TGCCTGTTCA TCTACGACGA	ACCCCCGGTA TTGACCCAG	ACAACAATGC CACTTCATAT	120
TGGGGACTTC GTCTGGGATT	CCAAGGTGCA TTCATTGCAA	AGTCCTTAA ATATTTCTC	180
ACTGCTTCCT ACTAAAGGAC	GGACAGAGCA TTTGTTCTTC	AGCCACATAC TTTCCTTCCA	240
CTGGCCAGCA TTCTCCTCTA	TTAGACTAGA ACTGTGGATA	AACCTCAGAA AATGCCACC	300
CAGCAGAAAG CCTCTGACGA	GAGGATCTCC CAGTTGATC	ACAATTGCT GCCAGAGCTG	360
TCTGCTCTTC TGGGCCTAGA	TGCAGTTTAG	TTGGCAAAGG AACTAGAAGA AGAGGAGCAG	420
AAGGAGCGAG CAAAAATGCA	GAAAGGCTAC AACTCTAAA	TGCCAGTGA AGCAAAAAGG	480
TTAAAGACTT TTGTGACTTA	TGAGCCGTAC AGCTCATGGA	TACCACAGGA GATGGCGGCC	540
GCTGGTTTT ACTTCACTGG	GGTAAAATCT GGGATTCACT	GCTTCTGCTG TAGCCTAAC	600
CTCTTGGTG CCGGCCTCAC	GAGACTCCCC ATAGAAGACC	ACAAGAGGTT TCATCCAGAT	660
TGTGGTTCC TTTGAACAA	GGATGTTGGT AACATTGCCA	AGTACGACAT AAGGGTGAAG	720
AATCTGAAGA GCAGGCTGAG	AGGAGGTAAA ATGAGGTACC	AAGAAGAGGA GGCTAGACTT	780
GCATCCTCA GGAACCTGGCC	ATTTTATGTC CAAGGGATAT	CCCCTGTGT GCTCTCAGAG	840
GCTGGCTTG TCTTACAGG	TAAACAGGAC ACGGTACAGT	GTTTTCTG TGGTGGATGT	900
TTAGGAAATT GGGAGAAGG	AGATGATCCT TGGAGGAAC	ATGCCAAATG GTTCCCCAAA	960
TGTGAATTTC TTCGGAGTAA	GAAATCCTCA GAGGAAATT	CCCAGTATAT TCAAAGCTAC	1020

AAGGGATTG TTGACATAAC GGGAGAACAT TTTGTGAATT CCTGGGTCCA GAGAGAATTA 1080
 CCTATGGCAT CAGCTTATTG CAATGACAGC ATCTTGCTT ACGAAGAACT ACGGCTGGAC 1140
 TCTTTAAGG ACTGGCCCCG GGAATCAGCT GTGGGAGTTG CAGCACTGGC CAAAGCAGGT 1200
 CTTTCTACA CAGGTATAAA GGACATCGTC CAGTGCTTT CCTGTGGAGG GTGTTAGAG 1260
 AAATGGCAGG AAGGTGATGA CCCATTAGAC GATCACACCA GATGTTTCC CAATTGTCCA 1320
 TTTCTCCAAA ATATGAAGTC CTCTGCGGAA GTGACTCCAG ACCTTCAGAG CCGTGGTGAA 1380
 CTTTGTGAAT TACTGGAAAC CACAAGTGAA AGCAATCTT AAGATTCAAT AGCAGTTGGT 1440
 CCTATAGTGC CAGAAATGGC ACAGGGTGAA GCCCAGTGGT TTCAAGAGGC AAAGAATCTG 1500
 AATGAGCAGC TGAGAGCAGC TTATACCAGC GCCAGTTCC GCCACATGTC TTTGCTTGAT 1560
 ATCTCTTCCG ATCTGCCAC GGACCACTTG CTGGGCTGTG ATCTGTCTAT TGCTTCAAAA 1620
 CACATCAGCA AACCTGTGCA AGAACCTCTG GTGCTGCCTG AGGTCTTGG CAACTTGAAC 1680
 TCTGTATGT GTGTGGAGGG TGAAGCTGGA AGTGGAAAGA CGGTCCCTCCT GAAGAAAATA 1740
 GCTTTCTGT GGGCATCTGG ATGCTGTCCC CTGTTAAACA GGTTCCAGCT GGTTTCTAC 1800
 CTCTCCCTTA GTTCCACCAAG ACCAGACGAG GGGCTGGCCA GTATCATCTG TGACCAGCTC 1860
 CTAGAGAAAG AAGGATCTGT TACTGAAATG TGCATGAGGA ACATTATCCA GCAGTTAAAG 1920
 AATCAGGTCT TATTCTTTT AGATGACTAC AAAGAAATAT GTTCAATCCC TCAAGTCATA 1980
 GGAAAATGAA TTCAAAAAAA CCACTTATCC CGGACCTGCC TATTGATTGC TGTCCGTACA 2040
 AACAGGGCCA GGGACATCCG CCGATACCTA GAGACCATTG TAGAGATCAA AGCATTCCC 2100
 TTTTATAATA CTGCTGTAT ATTACGGAAG CTCTTTCAC ATAATATGAC TCGTCTGGGA 2160
 AAGTTTATGG TTTACTTTGG AAAGAACCAA AGTTTGAGA AGATACAGAA AACTCCTCTC 2220
 TTTGTGGCGG CGATCTGTGC TCATTGGTT CAGTATCCTT TTGACCCATC CTTTGATGAT 2280
 GTGGCTGTTT TCAAGTCCTA TATGGAACGC CTTTCCTTAA GGAACAAAGC GACAGCTGAA 2340
 ATTCTCAAAG CAACTGTGTC CTCCTGTGGT GAGCTGGCCT TGAAAGGGTT TTTTCATGT 2400
 TGCTTTGAGT TTAATGATGA TGATCTCGCA GAAGCAGGGG TTGATGAAGA TGAAGATCTA 2460
 ACCATGTGCT TGATGAGCAA ATTTACAGCC CAGAGACTAA GACCATTCTA CCGGTTTTA 2520
 AGTCCTGCCCT TCCAAGAATT TCTTGCGGGG ATGAGGCTGA TTGAACCTCCT GGATTCAAGAT 2580
 AGGCAGGAAC ATCAAGATT TGGACTGTAT CATTGAAAC AAATCAACTC ACCCATGATG 2640
 ACTGTAAGCG CCTACAAACAA TTTTTGAAC TATGTCTCCA GCCTCCCTTC AACAAAAGCA 2700
 GGGCCCAAAA TTGTGTCTCA TTTGCTCCAT TTAGTGGATA ACAAAAGAGTC ATTGGAGAAT 2760

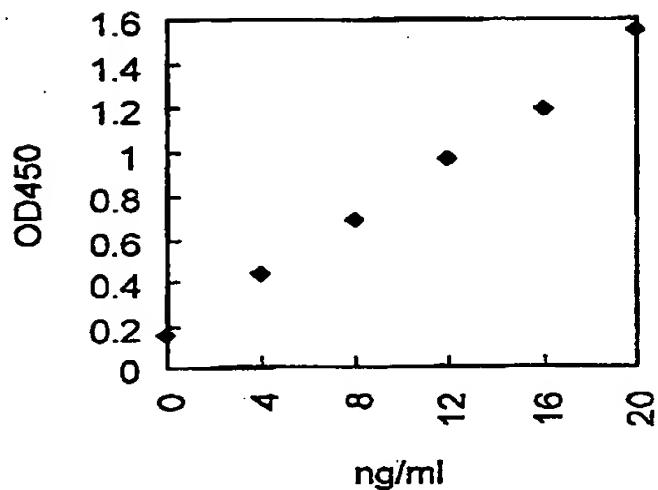
ATATCTGAAA ATGATGACTA CTTAAAGCAC CAGCCAGAAA TTTCACTGCA GATGCAGTTA 2820
 CTTAGGGAT TGTGGCAAAT TTGTCCACAA GCTTACTTT CAATGGTTTC AGAACATTAA 2880
 CTGGTTCTTG CCCTGAAAAC TGCTTATCAA AGCAACACTG TTGCTGCGTG TTCTCCATT 2940
 GTTTGCAAT TCCTTCAAGG GAGAACACTG ACTTTGGGTG CGCTTAACCT ACAGTACTTT 3000
 TTGACCAACC CAGAAAGCTT GTCATTGTTG AGGAGCATCC ACTTCCAAT ACGAGGAAAT 3060
 AAGACATCAC CCAGAGCACA TTTTCAGTT CTGGAAACAT GTTTGACAA ATCACAGGTG 3120
 CCAACTATAG ATCAGGACTA TGCTTCTGCC TTTGAACCTA TGAATGAATG GGAGCGAAAT 3180
 TTAGCTGAAA AAGAGGATAA TGAAAGAGC TATATGGATA TGCAGCGCAG GGCATCACCA 3240
 GACCTTAGTA CTGGCTATTG GAAACTTCT CCAAAGCAGT ACAAGATTCC CTGTCTAGAA 3300
 GTCGATGTGA ATGATATTGA TGTTGTAGGC CAGGATATGC TTGAGATTCT AATGACAGTT 3360
 TTCTCAGCTT CACAGCGCAT CGAACTCCAT TTAAACCACA GCAGAGGCTT TATAGAAAGC 3420
 ATCCGCCAG CTCTTGAGCT GTCTAAGGCC TCTGTCACCA AGTGCCTCAT AAGCAAGTTG 3480
 GAACTCAGCG CAGCCGAACA GGAACGTCTT CTCACCCCTGC CTTCCCTGGA ATCTCTGAA 3540
 GTCTCAGGGA CAATCCAGTC ACAAGACCAA ATCTTCCTA ATCTGGATAA GTTCCCTGTGC 3600
 CTGAAAGAAC TGTCTGTGGA TCTGGAGGGC AATATAAAATG TTTTTCTAGT CATTCCCTGAA 3660
 GAATTTCCAA ACTTCCACCA TATGGAGAAA TTATTGATCC AAATTCAGC TGAGTATGAT 3720
 CCTTCCAAAC TAGTAAAATT AATTCAAAAT TCTCCAAACC TTCATGTTT CCATCTGAAG 3780
 TGTAACCTCT TTTCGGATT TTGGTCTCTC ATGACTATGC TTGTTCCCTG TAAGAAACTC 3840
 ACAGAAATTAA AGTTTCGGGA TTCATTTTT CAAGCCGTCC CATTGTTGC CAGTTGCCA 3900
 AATTTATTCT CTCGAAGAT ATTAAATCTT GAAGGCCAGC AATTCCCTGA TGAGGAAACA 3960
 TCAGAAAAAT TTGCCTACAT TTTAGGTCT CTTAGTAACC TGGAAGAATT GATCCTTCCT 4020
 ACTGGGGATG GAATTATCG AGTGGCCAAA CTGATCATCC AGCAGTGTCA GCAGCTTCAT 4080
 TGTCTCCGAG TCCTCTCATT TTTCAAGACT TTGAATGATG ACAGCGTGGT GGAAATTGCC 4140
 AAAGTAGCAA TCAGTGGAGG TTTCCAGAAA CTTGAGAACCC TAAAGCTTCA AATCAATCAC 4200
 AAGATTACAG AGGAAGGATA CAGAAATTTC TTTCAAGCAC TGGACAACAT GCCAAACTTG 4260
 CAGGAGTTGG ACATCTCCAG GCATTTCACA GAGTGTATCA AAGCTCAGGC CACAACAGTC 4320
 AAGTCTTGA GTCAATGTGT GTTACGACTA CCAAGGCTCA TTAGACTGAA CATGTTAAGT 4380
 TGGCTCTGG ATGCAGATGA TATTGCATTG CTTAATGTCA TGAAAGAAAG ACATCCTCAA 4440
 TCTAAGTACT TAACTATTCT CCAGAAATGG ATACTGCCGT TCTCTCCAAT CATTCAAGAAA 4500

TAAAAGATT AGCTAAAAAC TGCTGAATCA ATAATTTGTC TTGGGGCATA TTGAGGATGT 4560
 AAAAAAAAGTT GTTGATTAAT GCTAAAAACC AAATTATCCA AAATTATTT ATTAAATATT 4620
 GCATACAAAA GAAAATGTGT AAGGCTTGCT AAAAAACAAA ACAAAACAAA ACACAGTCCT 4680
 GCATACTCAC CACCAAGCTC AAGAAATAAA TCATCACCAA TACCTTGAG GTCCCTGAGT 4740
 AATCCACCCC AGCTAAAGGC AAACCCCTCA ATCAAGTTA TACAGCAAAC CCTCCATTGT 4800
 CCATGGTCAA CAGGGAGGG GTTGGGACA GGTCTGCCAA TCTATCTAAA AGCCACAATA 4860
 TGGAAAGT ATTCAATTAA TATAATAAT GGCTAACTTA ACGGTTGAAT CACTTCATA 4920
 CATGGATGAA ACGGGTTAA CACAGGATCC ACATGAATCT TCTGTGGCC AAAATATGTT 4980
 CCTTAATCCT TGTAGAACCT GTCTTCTATA TTGAACTAGC TTTGGTACAG TAGAGTTAAC 5040
 TTACTTTCCA TTTATCCACT GCCAATATAA AGAGGAAACA GGGGTTAGGG AAAAATGACT 5100
 TCATTCCAGA GGCTTCTCAG AGTTCAACAT ATGCTATAAT TTAGAATTCTT CTTATGAATC 5160
 CACTCTACTT GGGTAGAAAA TATTTTATCT CTAGTGATTG CATATTATT CCATATCATA 5220
 GTATTCATA GTATTATATT TGATATGAGT GTCTATATCA ATGTCAGTGT CCAGAATTTC 5280
 GTTCCTACCA GTTGAGTAGT TTTCTGAACG GCCAGAAGAC CATTGAAAT TCATGATACT 5340
 ACTATAAGTT GGTAAACAAAC CATACTTTA TCCTCATTAA TATTCTCACT AAGAAAAAAG 5400
 TCAACTCCCC TCCCCTTGCC CAAGTATGAA ATATAGGGAC AGTATGTATG GTGTGGTCTC 5460
 ATTTGTTAG AAAACCACTT ATGACTGGGT GCGGTGGCTC ACACCTGTAA TCCCAGCACT 5520
 TTGGGAGGCT GAGGCGGGCG AATCATTGAA GGTGAGGAGT TCGAGACCGG CCTGGCCAGC 5580
 ATGGTGAAAC CCCATTTTG CTAAAGGTAC AAAAATTAGC CAGGTGTGGT GGCACATGCC 5640
 TGTGGTCCCA GCCACTGGGG CGGCTGAGAC GCAGGACTTG CTTGAACCCG GGAGGCAGAG 5700
 GTTGCAGTGA GCCGAGATGG CGCCACTGCA TTCCAGCCTG GGCAACAGAG CAAGACCTG 5760
 TCTGTTCAA AACAAAAAAC AAAACCACTT ATATTGCTAG CTACATTAAG AATTCTGAA 5820
 TATGTTACTG AGCTTGCTTG TGGTAACCAT TTATAATATC AGAAAGTATA TGTACACCAA 5880
 AACATGTTGA ACATCCATGT TGTACAACG AAATATAAT AATTGTCA ATTATACCTA 5940
 AATAAAACTG GAAAAAAAGA AAAAAAAAGA AAAAAAAAGA AAAA 5984

【書類名】 図面

【図1】

精製NAIP標準試料検定結果



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I Pの簡便かつ高精度の検定方法と、そのための材料を提供する。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列を有するヒト・アポトーシス抑制蛋白質N A I Pを特異的に認識するモノクローナル抗体であって、配列番号1のアミノ酸番号256-586のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドを含む免疫原によって免疫した哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞株との融合細胞であるハイブリドーマ細胞群がそれぞれ產生する抗N A I Pモノクローナル抗体と、これらの抗体を用いたN A I P検定方法、並びに検定キット。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 597144912
【住所又は居所】 神奈川県厚木市元町1-20 シャトレ・ストンリバ
- I I 2 0 7
【氏名又は名称】 酒井 治美
【代理人】 申請人
【識別番号】 100093230
【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
西澤国際特許事務所
【氏名又は名称】 西澤 利夫

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

出願人履歴情報

識別番号 [597144912]

1. 変更年月日 1997年10月14日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県厚木市元町1-20 シャトレ・ストンリバー1120
7

氏 名 酒井 治美

This Page Blank (uspto)